

PCT

世界知识产权组织
国际局



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号 5: C12N 15/19	A1	(11) 国际公布号: WO95/23861 (43) 国际公布日: 1995年9月8日 (08.09.95)
<p>(21) 国际申请号: PCT/CN95/00015</p> <p>(22) 国际申请日: 1995年3月6日 (06.03.95)</p> <p>(30) 优先权: 94112066.X 1994年3月4日 (04.03.94) CN</p> <p>(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海贝特生物技术公司 (SHANGHAI BETTE BIOTECHNOLOGY CO. LTD.) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路 320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN)。</p> <p>(72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 顾学范 (GU, Xuefan) [CN/CN]; 韩忠朝 (HAN, Zhongchao) [CN/CN]; 申庆祥 (SHEN, Qingxiang) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路 320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN)。</p> <p>(74) 代理人: 上海专利商标事务所 (SHANGHAI PATENT AND TRADEMARK AGENCY); 中国上海市桂平路 435号, 邮政编码:200233, Shanghai (CN)。</p>		<p>(81) 指定国: AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KR, LU, MX, NL, NO, NZ, PT, RO, RU, SE, SK, UA, US, VN, 欧洲专利 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>本国际公布: 包括国际检索报告。 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改时将重新公布。</p>
<p>(54) Title: HUMAN MEGAKARYOCYTOPOIENIN AND ISOLATION THEREOF, cDNA CLONING, AND PREPARATION OF THE RECOMBINANT PROTEIN</p> <p>(54) 发明名称: 人促巨核细胞生成素及其纯化、cDNA克隆和重组蛋白质的制备方法和应用</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a new hematopoietic cell growth factor, the human megakaryocytopoientin, its isolation from urine and serum of patients with aplastic anemia using the known biochemistry techniques, and its cDNA cloning method. This factor capable of promoting the colony-forming of megacaryocytes, enlarging the size of megakaryocytes, stimulating the proliferation of multipotential stem cell. This factor can be used for treating thrombocytopenia and hematocytopenia.</p> <p>(57) 摘要</p> <p>本发明涉及采用生化方法从再生障碍性贫血病人的尿和血清中分离出一种新的造血细胞生长因子--人促巨核细胞生长素, 经氨基酸序列分析, 从人胚肝cDNA文库克隆出该因子的cDNA, 继后在昆虫和中国仓鼠卵巢细胞体系中表达出有活性的重组蛋白质因子。经小鼠体内外试验和人体骨髓体外培养分析, 该因子促进巨核细胞集落形成, 增大巨核细胞体积, 刺激血小板的生成;还促进多能干细胞的增殖。该因子可用于治疗各种血小板减少症和全血细胞减少症。</p>		

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AM 亚美尼亚	CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	ML 马里	SK 斯洛伐克
AT 奥地利	DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	MN 蒙古	SN 塞内加尔
AU 澳大利亚	DK 丹麦		MR 毛里塔尼亚	SZ 斯威士兰
BB 巴巴多斯	EE 爱沙尼亚	KP 朝鲜民主主义人民共和国	MW 马拉维	TD 乍得
BE 比利时	ES 西班牙		MX 墨西哥	TG 多哥
BF 布基纳法索	FI 芬兰	KR 韩国	NE 尼日尔	TJ 塔吉克斯坦
BG 保加利亚	FR 法国	KZ 哈萨克斯坦	NL 荷兰	TM 土库曼斯坦
BJ 贝宁	GA 加蓬	LI 列支敦士登	NO 挪威	TT 特立尼达和多巴哥
BR 巴西	GB 英国	LK 斯里兰卡	NZ 新西兰	UA 乌克兰
BY 白俄罗斯	GE 格鲁吉亚	LR 利比里亚	PL 波兰	UG 乌干达
CA 加拿大	GN 几内亚	LT 立陶宛	PT 葡萄牙	US 美国
CF 中非共和国	GR 希腊	LU 卢森堡	RO 罗马尼亚	UZ 乌兹别克斯坦
CG 刚果	HU 匈牙利	LV 拉脱维亚	RU 俄罗斯联邦	VN 越南
CH 瑞士	IE 爱尔兰	MC 摩纳哥	SD 苏丹	
CI 科特迪瓦	IS 冰岛	MD 莫尔多瓦	SE 瑞典	
CM 喀麦隆	IT 意大利	MG 马达加斯加	SG 新加坡	
CN 中国	JP 日本		SI 斯洛文尼亚	

人促巨核细胞生成素及其纯化、cDNA 克隆和 重组蛋白质的制备方法和应用

[技术领域]

本发明涉及一种新的造血细胞生长刺激因子,即人促巨核细胞生成素(Human megakaryopoietin, 简称 MPO),更具体地说,涉及 MPO 的分离纯化、氨基酸顺序测定和其生物活性,以及编码这些蛋白质的 DNA 分子的克隆及其在宿主细胞中的表达。

[背景技术]

已知造血细胞是能增殖、分化,进一步产生成熟血细胞的前体细胞,有髓系造血细胞和淋巴系造血细胞之分,髓系造血细胞包括红细胞、白细胞和巨核细胞三个系列。红细胞主要负责体机组织中氧气、二氧化碳和一些营养物质或废物的交换。白细胞主要负责抵御感染的功能,巨核细胞则产生血小板,后者在机体止血和凝血中起关键作用。

已知造血细胞均来自一共同的多能干细胞,后者具有自我复制更新的能力,并在一定的条件下能进一步分化增殖为各系定向祖细胞。这些造血干细胞和祖细胞在体外培养体系中具有不同的增殖能力和细胞表型,据此可加以鉴别和分类。

已知造血是一个复杂的过程,受许多因子调节,包括各种细胞介素(Interleukin),集落形成刺激因子(Colony-forming Stimulating Factor, 简称 CSF,例如有 GM-CSF,G-CSF,M-CSF)和其它细胞生长刺激因子,如干细胞因子(Stem Cell Factor),促红细胞生成素(Erythropoietin, 简称 EPO)和成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor, 简称 FGF)。对巨核细胞血小板生成有刺激作用的因子有 IL1, IL3, IL6, IL11, GM-CSF, SCF 和 FGF(韩忠朝等,中华血液杂志, 14:159—161,1993; Caen & Han, C R Acad Sci Paris, 316:925—930, 1993)。这些因子均已采用基因重组技术生产,少数已用于临床试验或治疗,但它们对提高巨核细胞和血小板数量的作用不明显。此外,

这些因子的活性十分广泛,临床应用指征不明确,且具有一定的副作用。

已知再生障碍性贫血或化疗诱发骨髓衰竭的病人的血清和尿中含有很强的能促进巨核细胞生长和分化,增加血小板生成的活性物质,许多研究者试图去鉴别、分离这种物质,并已经分离纯化出一种血小板生成素(Thrombopoietin,又称 c-MPL Ligand),由 353 个氨基酸残基组成。人 c-MPL Ligand 的 cDNA 克隆由 1,774 个核苷酸组成,末端连接-poly(A)⁺,与促红细胞生成素有 23% 的序列相同,纯化的 c-MPL Ligand 的分子量为 28K-32K 或 18K-20K(SDS-PAGE 分析),因两者的序列相同,所以来自一共同的前体蛋白。该因子对巨核细胞的生长成熟有促进作用,但主要作用于生长的晚期阶段(de Sauvage 等, Nature, 369: 533-538; Bartley 等, Cell, 77:1196-1244; LoK 等, Nature 369:565-568)。

〔发明的描述〕

本发明的目的在于提供一种新的细胞生长刺激因子,该因子来源于再生障碍性患者的血清和尿,具有促进造血干细胞向巨核细胞分化生长、调节巨核细胞生长、分化和成熟的活性。经小鼠体内外试验和人体骨髓体外培养分析,该因子促进造血干细胞向巨核细胞分化、巨核细胞集落形成,增大巨核细胞体积,刺激血小板的生成;该因子还促进多能干细胞的增殖,可用于治疗各种血小板减少症和全血细胞减少症。按其生物学特征,取名为人促巨核细胞生成素(Megakaryopoietin,以下简称 MPO)。

本发明的另一个目的在于,建立一套 MPO 的纯化方法。

本发明的还有一个目的在于,建立一套 MPO 的 cDNA 克隆方法和采用重组 DNA 技术,通过现在通用的表达体系,生产有活性的重组人 MPO 的方法。

本发明包括 MPO 的纯化方法。在本发明的下述几个实施例中,将亲和层析(麦胚凝集素亲和层析和肝素亲和层析)与其他常规分离法相结合,从再障性病人的尿和血清中分离纯化出人促巨核细胞生成素。使

用本发明的分离纯化方法,从表达 MPO 的昆虫和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养液中同样地可以分离纯化出有刺激巨核细胞生长作用的蛋白质。因此,本发明的分离纯化方法是有效的 MPO 分离纯化方法。本发明的分离方法技术新颖、重复性好,产率也高。

在本发明的实施例中,使用的其他常规分离方法,包括提取、浓缩、沉淀、凝胶层析和高效液相层析,也可以包括电泳或其他类似的方法以及洗涤、搅拌、振荡、过滤等。

在本发明的实施例中,使用麦胚凝集素偶联的琼脂糖和肝素偶联的琼脂糖,将非亲和性的部分分离开来,极有效地提高了含 MPO 的蛋白质部分的单位特异性活性,有利于其后的用高效液相层析进行的分离。使用的载体除琼脂糖外,也可以是任何能与麦胚凝集素或肝素偶联的其他支承物或载体,如共知的聚苯乙烯、葡聚糖、天然或改性的纤维素、聚丙烯酰胺等。

MPO 纯化方法中各分离步骤的最佳组合和最佳分离纯化条件,本领域的技术人员可以通过常规实验方法加以确定。

本发明还包括编码 MPO 的 DNA 分子的克隆及其在宿主细胞中的表达。在本发明的下述一个实施例中,确定了纯化的人促巨核细胞生成素的分子量范围和氨基酸序列。并在另二个实施例中,根据蛋白质顺序,设计出相应的核苷酸引物,在人胚肝 cDNA 文库中克隆出 MPO 的 cDNA,并测出其核苷酸顺序,继后在昆虫和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞体系中表达出有活性的重组蛋白质因子。

在对人尿 MPO 用反相高效液相层析(HPLC)进行最后的分离后得到的产物中,我们发现二个活性高的组分,经¹²⁵I 标记后作聚丙烯酰胺电泳分析,其分子量在还原状态下(加二巯基醇)为 24—32Kd,在非还原状态下为 35—45Kd。将 35—45Kd MPO 蛋白用 2%胰蛋白酶消化处理,经氨基酸序列分析,确定了 MPO 蛋白的氨基酸序列。

根据获得的氨基酸序列,用已知的遗传密码推测与氨基酸相应的核苷酸,我们设计了多对变性引物进行 PCR 扩增。其中一对变性引物在以胚肝 cDNA 文库为模板的扩增中获得一条特异性扩增带,变性引物序列如下:1)TGAAAYTG YG AYTAAAYTG YCARCAYTAY

ATGGA; 2) TTYGGNGGNT TRTTYTTYTT YTGNTTYTTY CANTADCT。所获特异扩增带的 cDNA 经序列测定,证实与 MPO 的氨基酸序列吻合。

此特异性 cDNA 扩增产物用 DIG-dUTP 标记,将其作为探针筛选入胚肝 cDNA 文库。在直径为 14cm 的琼脂平板中播下 4—5 万个克隆,用尼龙膜转移,尼龙膜经变性及缓冲处理后与标记的 cDNA 探针杂交,经洗脱及荧光显影,在 X 光底片上获得图象。

由于使用的 cDNA 文库的质粒为 λ -ZAP。筛选到的阳性克隆可以用 R408 辅助噬菌体进行菌体内 pBluescript 的切除,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上克隆,再经多次亚克隆和 DNA 测序,获得 MPO cDNA 序列,经比较截止 1995 年 2 月的基因和氨基酸资料库(cDNA 序列与 EMBL, Genbank 比较,氨基酸序列与 Swissprot 资料库比较),未见有相同的 cDNA 序列。

然后,根据获得的 MPO cDNA,构建含 MPO cDNA 的转移载体,在宿主细胞中表达 MPO。用 EcoRI 和 pstI 酶解质粒 pGEM-MPO(本实验室构建),回收 MPO cDNA 片段,克隆入 pVL 1392 的 EcoRI 和 PstI 位点之间,产生的质粒 pVL 1392 MPO 与 BaculoGold™ 线性化的病毒基因组 DNA 共转染 Sf9 昆虫细胞,根据被转染的细胞形态的变化,筛选出重组病毒 AcNPV-MPO。重组病毒转染昆虫细胞 4 至 8 天后,其上清液经初步分离纯化,其蛋白组份比未转染的昆虫细胞培养上清液多出一分子量为 45Kd 的蛋白质,且对巨核细胞集落形成有明显的刺激作用。

用 EcoRI 和 BamHI 酶解 pGEM-MPO,用 LMP Agarose 回收 MPO cDNA 片段,真核表达载体 pSV2-dhfr 用 Hind III 酶解。将 MPO 基因片段和 Hind III 酶切过的 pSV2-dhfr 填平后连接,产生质粒 pSV2-MPO。随后用 pSV2-MPO 转染 CHO-dhfr⁻细胞,从中挑取 dhfr⁺克隆 69 个,用 PCR 方法产生 237bp 片段,经 [³²P] 标记后作为探针,杂交阳性,证实 MPO 基因的存在。部分克隆作氨甲喋呤(MTX)加压,以扩增基因,增加表达量。加压后的细胞裂解液作 SDS-PAGE 分析。条件培养液经生物活性测定,证实对巨核细胞集落形成有明显的刺激作用。

上述的克隆, 克隆分离, 鉴别, 定性和测序的程序在后面的实施例中得更详细地描述。

MPO 也可以通过其它类型的重组细胞而产生, 如原核细胞的大肠杆菌, 或其它真核细胞, 比如酵母细胞。构建适当的携带编码 MPO cDNA 的表达载体, 用来转化宿主细胞 (如大肠杆菌或酵母细胞) 或感染昆虫细胞, 以产生重组的 MPO 的方法, 在本领域是共知的。例如, 可参见 Ausubel 等人编著的 “Current Protocols in Molecular Biology” Current Protocols, 1993; 和 Sambrook 等人编著的 “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第二版, Cold Spring Harbor Press, 1989。

本发明还涉及 MPO 的活性突变蛋白和活性片段, 还涉及由融合于另一多肽或蛋白质的天然 MPO, 或它们的活性突变蛋白或它们的活性片段组成的融合蛋白, 融合蛋白发挥相似的促进巨核细胞生长分化的生物学活性。

将构建的含编码 MPO、它们的活性片段、突变蛋白或融合蛋白的 DNA, 和操纵转录与翻译调控信号的 DNA 序列的载体导入真核生物宿主细胞中。为了能选出已导入的 DNA 稳定地整合入染色体中的细胞, 可以使用一种或多种标记以选择含表达载体的宿主细胞。标记可以将营养缺陷型宿主, 提供耐致命物质 (如抗菌素) 的能力, 提供抗重金属如铜的耐性, 或类似的性能。可选择的标记基因可以直接连于待表达的基因顺序, 也可以通过共转染一起引入同一细胞。也需要一些额外的因子以最理想地合成出单链结合蛋白 mRNA。这些因子可以包括拼接信号, 以及转录启动子, 增强子和终止信号。

为了表达 MPO 蛋白、它们的活性片段或衍生物, 最好将待引入已选择好的细胞的 DNA 分子插入到一个能在受体宿主中自主复制的质粒或病毒载体中。

在选择特定质粒或病毒载体中的重要因素包括: 能方便地识别并将含有载体的受体细胞从不含载体的受体细胞中选择出来; 在特定宿主中所期望的载体的拷贝数目; 是否有利于使载体在不同种的宿主细胞之间“穿梭”。

理想的真核生物质粒包括 pVL1392、pSV2 等或它们的衍生物。这些质粒是本领域中共知的。

一旦制备好含目的基因的表达式载体，可以通过一系列合适的方法中的任何一种将表达式载体引入适当的宿主细胞，如通过转化、转染、脂质体载体转染、接合作用、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙沉淀法、直接显微注射法等。

用于本发明的宿主细胞可以是原核或真核生物的。理想的原核生物宿主包括细菌如大肠杆菌 (*E. Coli*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、沙门菌属 (*Salmonella*)、沙雷菌属 (*Serratia*) 等。在这些条件下，蛋白质将不被糖基化。原核生物宿主必须可与表达式质粒中的复制子和控制顺序相容。

然而，因为 MPO 是糖基化的蛋白，所以真核生物宿主优于原核生物宿主。理想的真核生物宿主是哺乳动物细胞，如人、猴、小鼠和中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，因为这些细胞可提供蛋白质分子翻译后的修饰，包括正确的折叠，形成正确的二硫键以及在正确的位点糖基化。同样，酵母细胞和昆虫细胞也可进行翻译后肽的修饰，包括高度的甘露糖基化。有许多使用强启动子顺序和高拷贝数目质粒的重组 DNA 策略，可用来在酵母和昆虫细胞中产生所期望的蛋白质。酵母细胞识别克隆的哺乳动物基因产物上的引导顺序并分泌带引导顺序的肽。引入载体后，宿主细胞在选择培养基上生长，选择含载体的细胞。克隆的基因顺序的表达导致产生 MPO 或它的融合蛋白或突变蛋白、或其活性片段。

此处所用的术语“突变蛋白”指 MPO 的类似物，其中一个或多个天然 MPO 或其活性片段的氨基酸残基被不同的氨基酸残基所替换或缺失，或者一个或多个氨基酸残基被加入到天然 MPO 的顺序中。而且，与天然的 MPO 的活性片段相比，没有显著改变所得到的产物的活性。这些突变蛋白可以用已知的人工合成和/或定点诱变技术或任何其它已知的适合用于该目的的技术来制备。

任何一种这样的突变蛋白最好具有与 MPO 的氨基酸顺序足够一样的氨基酸顺序，从而使其具有与 MPO 或其活性片段实质上相似的

活性。

在较佳的具体例子中，任何这样的突变蛋白与 MPO 至少具有 40% 的一致性或同源性。更佳的具有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或最佳的具有至少 90% 一致性或同源性。

根据本发明所能使用的 MPO、多肽或它们的活性片段的突变蛋白，或者为其编码的核酸，包括一系列有限的实质上对应的置换肽或多聚核苷酸顺序，它们可以由本领域的一般熟练技术人员，依据此处给出的说明和指导，通过适当的实验方法常规地获得。

根据本发明，较佳的突变蛋白的改变是那些已知的“保守的”置换。MPO 或多肽或它们的活性片段的保守的氨基酸置换可以包括一组同义氨基酸，这些氨基酸具有足够相似的物化性能使得组中氨基酸之间的置换会保留该分子的生物学功能 [Grantham, Science, Vol, 185, pp. 862-864 (1974)]。已经清楚，在上述限定的顺序中也可以插入或缺失一些氨基酸而不改变其功能，尤其是如果插入或缺失只包括少数氨基酸例如小于 30 个，较佳的小于 10 个，并且不去除或替换对功能构象至关重要的氨基酸如 Cys 残基时 [Anfinsen, “Principles That Govern The Folding of Protein Chains”, Science, Vol., 181, pp. 223-230 (1973)]。这样的缺失和/或插入而形成的蛋白质和突变蛋白归于本发明的范围。

本发明的突变蛋白包括由核酸如 DNA 或 RNA 编码的蛋白质，这些核酸在严谨条件下会与编码本发明的 MPO 的 DNA 或 RNA 杂交。本发明还包括一类核酸，它能作为探针用于鉴别和纯化所期望的核酸。此外，该核酸是主要的候选对象，以确定它是否编码一种具有本发明的 MPO 功能活性的蛋白质。

本发明的重要用途在于：

(1) 可以采用已经建立的分离方法从人或动物的尿和血清中大量纯化天然 MPO。由于天然人 MPO 主要存在于再生障碍性贫血病人的血和尿中 (Hoffman, Blood, 74:1196-1212, 1989, Han et al, Int J Hematol, 54:3-14, 1991) 来源有限，不易大量制备，但假如将某些动物如牛、狗、猪或老鼠进行照射，造成继发性再生障碍性贫血，然后制备

血清,再采用本发明的方法纯化分离 MPO,则来源充足;

(2)按照本发明所述的 MPO 的 cDNA 克隆方法,可以设计出与 MPO 不完全相同的变性引物进行 PCR 扩增,从而进一步获得 MPO 的类似物的 cDNA。

(3)根据本发明提供的 MPO cDNA 序列,采用重组 DNA 技术,可通过现在通用的各种表达体系,如大肠杆菌,酵母菌,昆虫或哺乳类动物细胞的表达,大量生产重组的 MPO 及其变异物。我们在昆虫和 CHO 细胞成功表达出重组人 MPO 便充分证明了这一用途;

(4)MPO 和其突变因子作为造血细胞生长因子,可广泛用于研究血细胞的生长调节并可用作体外造血干细胞和祖细胞、巨核细胞和血小板生长和大量扩增的重要试剂。

(5)整个 MPO 蛋白质分子或其活性多肽片段或该因子的突变蛋白单独可制作成药物治疗各种原因引起的血小板减少和全血细胞减少;

(6)MPO 蛋白质分子或其活性多肽片段或该因子的突变蛋白与一些能增加其活性的物质(如粘多糖或脂)组成的复合制剂可用作药物,治疗各种原因引起的血小板减少和全血细胞减少;

(7)MPO 蛋白质分子或其活性多肽片段或该因子的突变蛋白与一些造血细胞生长因子(SCF,EPO,TPO,GM-CSF 和 IL3)体外合用,对红系和粒系祖细胞的生长也有作用,因此与治疗有效量的这些生长因子配伍合用,可治疗其它全血细胞减少症。

(8)MPO 和其突变因子可用作抗原在鼠、兔子和羊等动物身上制备单克隆和多克隆抗体,MPO 及其抗体可配备成试剂盒,用于 MPO 水平测定和定位,可作为与巨核细胞和血小板有关疾病的诊断和科研试剂,抗 MPO 抗体还可用于因 MPO 水平增高引起的有关疾病的治疗药物,

(9)MPO 及其抗体,可用作鉴别分离 MPO 受体的重要工具,这可通过目前通用的受体鉴别分离方法来进行。

[附图说明]

图 1 一个阳性克隆的亚克隆原位杂交图。黑点表示阳性克隆。

图 2 克隆质粒 pGEM-MPO 结构示意图。

图 3 多角体病毒表达载体 pVL 1392-MPO 构建示意图。

图 4 肝素柱分离峰 II 的 SDS-PAGE 银染分析结果。

Lane 1: 实验样品; Lane 2: 对照样品。箭头指表达产物 MPO 条带。

图 5 表达质粒 pSV2-MPO 构建示意图。

图 6 含 MPO 基因的 CHO 细胞裂解液的 SDS-PAGE 银染分析结果。

Lane 1: 实验样品; Lane 2: 对照样品。箭头指产物 MPO 条带。

[最佳实施方式]

下面, 结合实施例, 对本发明作进一步地说明, 但本发明并不受限于下述实施例。

实施例 1 人尿 MPO 的分离纯化

收集再障病人的尿 55 升, 随即用 Amicon 的 YM10 过滤器将尿超滤浓缩。然后用 Sephadex G50 层析脱盐。将所得的蛋白部分用 3M 氯化胍处理, 再按下列流程所示方法分离纯化。

MPO 分离流程(流程 1)

1. 氯化胍(3M)处理
↓
2. 乙醇沉淀(60—90%饱和)
↓
PBS 透析
↓
3. 麦胚凝集素(WGA)—Sephadose 6MB(Pharmacia LKB)
↓
含 0.2M 乙酰葡萄糖胺的 PBS 洗脱
↓
4. 反相 HPLC—C₁₈柱(美国 VYDDC 公司, Cat# 218TP510)
↓
溶剂: A: 0.1% 三氟醋酸
B: 70% 乙腈—0.1% 三氟醋酸
流速: 0.5ml/分, 1.5ml/管
从 A 液→B 液线性梯度洗脱 40 分钟
↓
5. Superose 6—HPLC (Pharmacia LKB)
↓
PBS 作为缓冲液
↓
6. 肝素—Sephadose CL—6B 柱(Bio—Rad).
↓
2M NaCl 洗脱
↓
收集蛋白峰
↓
7. 反相 HPLC—Nucleosil C₄ 柱(4.6×30mm,
日本 TOUZART & Matignon 公司产品)
或反相 HPLC—C₈ 柱(4.6×30mm,
美国 Applied Biosystems 产品)

每步分离后,采用小鼠骨髓体外血浆凝块法(Han et al, Br J Haematol, 81:1—5, 1992)对所有的组份都作活性分析,具有明显刺激巨核细胞生长的组份随即进行下一步的分离纯化,人尿促巨核细胞生成素的纯化与活性分析结果见表 I。

表 1: 人尿促巨核细胞生成素分离纯化及活性分析

分离步骤(活性部位)	特异性活性 集落数/mg	总纯化指数
1. 尿蛋白(Sephadex G50 后)	3	1
2. 酒精沉淀物(60-90%饱和度)	300	30
3. 麦胚凝集素柱(亲和部分)	4100	≈1400
4. 反相 HPLC-C18(20-26 管)	7600	≈2530
5. Superose-6 层析柱		
(1)(20-22 管)	12000	4000
(2)(35-37 管)	11000	≈3300
6. 肝素柱(亲和部分)		
(1)5-(1)组份	86000	≈28700
(2)5-(2)组份	49000	≈16300
7. 反相 HPLC-C4		
(1)6-(1)组份(8-9 管)	143000	≈47700
(2)6-(2)组份(8-9 管)	138000	46000

骨髓细胞来自 Balb/c 小鼠。巨核细胞培养和鉴别方法按文献(Han et al, Br J Haematol 81, 1-5, 1992)进行。

从表 1 的结果可知,通过流程 1 的 MPO 分离纯化方法,人尿中促巨核细胞生成素明显地得到了分离、纯化。

实施例 2 人血清 MPO 的分离纯化

收集再障病人的血清 550 毫升,经 3M 氯化胍处理后,按流程 1 所示的方法进行人血清促巨核细胞生成素的分离纯化。其活性分析方法同实施例 1,结果如下:

表 2. 人血清促巨核细胞生成素纯化及活性分析

分离步骤(活性部位)	特异性活性 巨核细胞集落数/mg	总纯化指数
1. 血清	10	1
2. 乙醇沉淀物(60-90%饱和度)	400	40
3. 麦胚凝集素亲和层析(亲和部分)	5000	500
4. 反相 HPLC-C18(第 23-25 管)	9500	950
5. Superose-6 层析(第 20-22 管)	17000	1700
6. 肝素亲和层析(亲和部分)	3000	3000
6. 反相 HPLC-C4(第 8-9 管)	68000*	6800*

* 因蛋白量很小,其浓度为估计值。

从表 2 的结果可知,与人尿 MPO 一样,人血清 MPO 也可以通过流程 1 所示的方法进行分离纯化。

实施例 3 MPO 氨基酸序列的分析

在实施例 1 中经反相 HPLC-Nucleosi C₄柱或 C₈柱分离得到的产物中,我们发现二个活性高的组分,经¹²⁵I 标记后作聚丙烯酰胺电泳分析,其分子量在还原状态下(加二巯基醇)为 24-32Kd 和 7-13Kd(表 1 的 35-37 管),在非还原状态下为 35-45Kd 和 7-13Kd。

将上述 35-45Kd 的 MPO 蛋白质 30 微克用 2%胰蛋白酶消化处理后,用美国 Applied Biosystems 公司的 473 型氨基酸序列分析仪进行氨基酸序列分析。其结果如序列 1 所示。

实施例 4 MPO 的 cDNA 分子克隆

根据实施例 3 中 MPO 的氨基酸序列中的二条肽序列:1)DATC-NCDYNC QHYMECCPD;2)SPKPPNKKKT KKVIESEE,用已知的遗传密码推测与氨基酸相应的核苷酸,我们设计了多对变性引物进行 PCR 扩增。其中一对变性引物为:1)TGAAAYTGYG AY-TAYAAAYTG YCARCAYTAY ATGGA;2)TTYGGNGGNT TRT-TYTTYTTT YTGNTTYTTY CANTADCT(其中 Y=C. Y, R=A. G, N=A. C. G. T, D=G. A. T)。在以胚胎肝 cDNA 文库为模板的扩增

中获得一条特异性扩增带。所获特异扩增带经 DNA 序列测定(见序列 2)证实与氨基酸序列吻合(见序列 1)。

此特异性 cDNA 扩增产物用 DIG-dUTP(BOEHRING 产品)标记,作为探针筛选人胚肝 cDNA 文库。在直径为 14cm 的琼脂平板中播下 4—5 万个克隆,用尼龙膜转移,尼龙膜经变性及缓冲处理后与标记的 cDNA 探针杂交,经洗脱及荧光显影,在 X 光底片上获得图象(图 1)。在 100 万个克隆中共筛选出 2 个阳性克隆。

由于使用的 cDNA 文库的质粒为 λ -ZAP,筛选到的阳性克隆可以用 R408 辅助噬菌体进行体内 pBluescript 的切除,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上克隆,再经多次亚克隆和 DNA 测序,获得了序列 2 所示的 MPO cDNA 序列,MPO cDNA 全长 1389bp,编码 441 个氨基酸残基(序列 1),经比较 1995 年的基因资料库(见前述),未见有相同的 cDNA 序列。

我们采用重组 DNA 技术,在昆虫细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中表达出有刺激巨核细胞生长活性的 MPO。

实施例 5 MPO 在昆虫细胞中的表达

含 MPO cDNA 转移载体的构建和重组病毒的筛选

分子克隆主要参考 Sambrook 等的方法(Sambrook, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.)。pGEM 质粒购自 Promega 公司。将 MPO cDNA 克隆入 pGEM,构成质粒 pGEM-MPO。此为 MPO cDNA 来源(见图 2)。用 EcoRI 和 PstI 酶解质粒 pGEM-MPO,回收 MPO cDNA 片段,克隆入昆虫细胞表达质粒 pVL 1392 的 EcoRI 和 PstI 位点处(图 3)。经琼脂糖电泳鉴定 cDNA 插入方向,有 1.4Kb 片段出现,说明 cDNA 插入方向是正确的,构建成的质粒称作 pVL1392-MPO。在这种情况下,MPO cDNA 的表达受控于 AcNPV 多角体病毒启动子,以非融合蛋白形式表达。用产生的重组质粒 pVL 1392-MPO 和 BaculoGold™ 线性化的病毒基因组 DNA(Parmigen 公司)共转染 Sf9 昆虫细胞(Christopher & Christopher, DNA cloning: A practical approach 1985, 3:163, IRL Press, Oxford.)。借助于倒置显微镜观察被

转染的细胞形态的变化,筛选出重组病毒 AcNPV-MPO。抽提重组病毒基因组 DNA,用一对引物[(1)GATGGCATGGAAAACACTTCCCC (MK2, 22mer);(2)TCGAAGGACTCAAAGCAGCGGC(MKR2,22mer)。用 Applied Biosystems DNA 合成仪合成。],作 PCR 扩增,产生 237bp 片段;用 Boehringer Mannheim Biochemicals 的随机引物试剂盒和 Amersham 公司的[α - 32 P]-dATP 制备 32 P 标记的 MPO cDNA,将其作探针,进行杂交分析,结果均为阳性,这进一步证实重组病毒含有 MPO cDNA 插入物,产生的重组病毒称作 AcNPV-MPO。

MPO cDNA 在昆虫细胞中的表达及其产物的初步分离

在无血清培养基(Sf-900, Gibco 公司产品)中培养昆虫细胞。用重组病毒 AcNPV-MPO 感染昆虫细胞 144 小时后,收集培养液,超离心($100,000\times g$)45 分钟,取上清液,作肝素-Sephrose CL-6B(简称肝素)柱和麦胚凝集素-Sephrose 6MB(简称 WGA)柱分离纯化。肝素柱(Pharmacia 公司产品) $1.0\times 20\text{cm}$,200ml 样品过柱二次后,柱先用 PBS 淋洗,后分别以含 0.5MNaCl 和 1.0MNaCl 的磷酸缓冲液(pH7.2)洗脱,分别合并洗脱峰,对 0.01% NH_4HCO_3 溶液透析,冰冻干燥后备用。WGA 柱(Pharmacia 公司产品) $2\times 15\text{cm}$,200ml 样品过柱二次后,柱先用 PBS 淋洗,后以含 0.5M 乙酰葡萄糖胺的 PBS 溶液洗脱,合并洗脱峰,对 0.01% NH_4HCO_3 溶液透析,冰冻干燥备用。经肝素柱和 WGA 柱分离的样品作 SDS-PAGE 分析(Chen, W. et al. J. Biol. Chem., 266:4082, 1991)和生物活力测定。

肝素柱分离峰 II 产物的电泳结果(图 4),与对照相比,至少多一分子量为 45Kd 的额外条带。生物活性测定表明,昆虫细胞表达的 MPO 有促进巨核细胞集落形成的作用,加入不同的粗纯化物,与对照相比,均有 40%的促进作用(见表 3)。

表 3. 表达 MPO 的昆虫细胞培养液对小鼠巨核细胞的作用

	加入量(μ l)	巨核细胞集落/ 10^5 种植细胞
PBS	100	29 \pm 5
不表达 MPO 的昆虫细胞培养液	10	9 \pm 3
	100	3 \pm 1
表达 MPO 的昆虫细胞培养液	10	78 \pm 6*
	100	87 \pm 5*

有*者表示与 PBS 组或与不表达 MPO 的细胞培养组比较, $P < 0.05$ 。
 本实验结果为二次实验的平均值。

实施例 6 MPO 在 CHO 细胞中的表达

表达载体的构建

质粒的提取和酶解, DNA 片段的分离纯化、体外重组及转化均按文献(Sambrook, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.)报道的方法进行。

进行 DNA 重组与扩增的宿主细菌 *E. coli* JM103 和真核表达载体 pSV2-dhfr 为 Gibco-BRL 公司产品, 表达宿主细胞 CHO-dhfr⁻, 购自美国 ATCC 公司。pGEM-MPO 为 MPO cDNA 的来源, DNA 限制性内切酶购自 Promega 公司, 随机引物标记试剂盒系 Boehringer Mannheim Biochemicals 产品。[α -³²P]-dATP 为 Amersham 公司产品。细胞培养基和胎牛血清为 Gibco 产品, 聚合酶反应(PCR)引物为: (I)GATGGCATGGAAAACACTTCCCC (MK2, 22mer) 和 (II)TCGAAGGACTCAAAGCAGCGGC (MKR2, 22mer), 用 Applied Biosystems DNA 合成仪合成。

pGEM-MPO 经 EcoRI 和 BamHI 酶切, 用 LMP 琼脂糖回收基因片段, pSV2 dhfr 用 Hind III 酶解。MPO 基因片段和 Hind III 酶切过的

pSV2-dhfr 经填平后连接,产生质粒 pSV2-MPO. 用 ApaI 酶解产生 1872bp 和 4531bp 片段,说明 MPOcDNA 片段插入方向正确,基因表达受控于 SV40 早启动子(图 5)。

细胞培养、转染及氨甲喋呤加压扩增和 MPO 的表达

CHO-dhfr⁻细胞先培养于非选择性培养液(Ham's F12+150μg/ml 脯氨酸+10%胎牛血清+100IU/ml 青霉素+100μg/ml 链霉素)中,37℃,5%CO₂ 孵箱培养。转染前一天,取对数生长期细胞,0.1%胰蛋白酶(Sigma)消化,60mm 培养皿中接种 1×10^9 细胞,培养 20—24 小时,转染前 3 小时换液一次,用磷酸钙沉淀法(Christopher, R. B. and Christopher C. G. H. A practical approach 3:163, 1985. IRL Press, Oxford.)将质粒 DNA 导入细胞,继续培养 24 小时后,换成选择性培养液(DMEM+150μg/ml 脯氨酸+10%透析胎牛血清+100IU/ml 青霉素+100μg/ml 链霉素)、每 3—4 天换液一次,12—20 天后计 dhfr⁺细胞集落,计转染效率,并用细胞集落分离器挑出集落,建立克隆培养,逐渐增加氨甲喋呤(Methotrexate MTX, Sigma)浓度进行加压扩增。

挑取 69 个 dhfr⁺克隆,用与实施例 5 相同方法进行 PCR 扩增,产生 237bp 片段;用 [³²P] 标记探针,杂交阳性,证实 MPO 基因的存在,挑选出其中 9 个克隆作 MTX 加压,以扩增基因,增加表达量,细胞株用 0.025μM 和 0.05μM MTX 加压,细胞裂解液作 SDS-PAGE 分析(Chen, W. et al. J. Biol. Chem, 266:4082, 1991),与仅用 pSV2-dhfr 质粒转染所得的细胞相比,CHO-MPO 至少多一分子量为 49Kd 的额外条带(图 6)。条件培养液作活性测定,证实对巨核细胞集落形成有明显的刺激作用,具体结果见表 4。

表 4. 表达 MPO 的 CHO 细胞培养液对小鼠巨核细胞生长的作用

	加入量(μ l)	巨核细胞集落 / 10^5 种植细胞
PBS	50	27 ± 3
不表达 MPO 的 CHO 细胞培养液	50	31 ± 3
表达 MPO 的 CHO 细胞培养液	50	$67 \pm 4^*$

有*者表示与 PBS 组或与不表达 MPO 的细胞培养液比较, $P < 0.05$ 。

本实验结果为二次实验的平均值。

实施例 7 人尿 MPO 对 CFU-MK 和 CFU-GM 生长的作用

将本发明纯化的人尿 MPO 对 Balb/c 小鼠骨髓巨核细胞祖细胞 (CFU-MK), 粒单细胞祖细胞 (CFU-GM) 和红细胞祖细胞 (BFU-E) 生长的作用, 按 Han 等报道的方法 (Br J Haematol, 1990; 74:395—401) 进行体外实验分析, 发现人尿 MPO 对小鼠骨髓巨核细胞生长有明显的刺激作用, 具体结果见表 5。

表 5

因子	浓度 (ng/ml)	CFU-MK (/2×10 ⁵ 细胞)	CFU-GM	BFU-E
1)MPO	0	2±0.5	4±0.9	0
2)MPO	10	21±3.0 *	5±1	0
3)MPO	50	46±4.1 *	6±1	2±0.5
4)IL3	50	43±3.2	32±5	3±0.5
5)IL3+MPO	50+50	72±5.4 * #	42±3	3±0.8
6)IL6	20	18±1.6	15±3	1±0.3
7)IL6+MPO	20+50	57±1.2 * #	8±1	1.5±0.4
8)EPO	1U	12±3	7±2	33±2
9)EPO+MPO	1U+50	66±5 #	13±2	55±2 #
10)SCF	20	11±2	10±1	3±1
11)SCF+MPO	20+50	56±3	22±2 #	8±2

* 与 MPO 空白组对照, $P < 0.05$ 。

与加同一因子,但未加 MPO 组对照, $P < 0.05$ 。

实施例 8 人尿 MPO 对正常人 CFU-MK 和 CFU-GM 作用

采用已报道的方法(Han et al, Blood 75:1234—1239,1990)进行人骨髓 CFU-MK 和 CFU-GM 的培养。在培养时,加入本发明的人尿 MPO,发现人尿 MPO 对人骨髓巨核细胞生长有明显的刺激作用。具体结果见表 6。值得指出的是肝素的加入,使 MPO 的活性明显增强,提示肝素与 MPO 合用可产生协同作用。

表 6

MPO 浓度(ng/ml)	肝素 (μ g/ml)	CFU-MK 集落数/ 2×10^5 细胞	CFU-GM 集落数/ 2×10^5 细胞
0	0	1 ± 0.2	13 ± 0.7
10	0	7 ± 2	14 ± 1
50	0	$28 \pm 3 *$	14 ± 2
100	0	$48 \pm 2 *$	19 ± 3
0	10	2 ± 0.3	12 ± 2
10	10	$31 \pm 3 *$	16 ± 3
50	10	$42 \pm 5 *$	15 ± 2
100	10	$65 \pm 5 *$	16 ± 3

显著性测验,均为 $P < 0.05$, 其中,有 * 者, $P < 0.01$ 。

实施例 9 人尿 MPO 对小鼠巨核细胞直径的影响

已知巨核细胞直径是判断巨核细胞成熟程度的指标之一。我们采用已报道的方法(Han et al, Br. J. Haematol., 81:1—5, 1992), 在进行小鼠巨核细胞培养时, 加入人尿 MPO, 发现人尿 MPO 能增加巨核细胞的直径, 对巨核细胞的成熟有促进作用。具体结果见表 7。

表 7

	未加 MPO 组	加 MPO(50ng/ml)组	加 MPO(100ng/ml)组
巨核细胞直径(μ m)	28 ± 4	$39 \pm 3 *$	$42 \pm 4 *$

每组共测量了 200 个巨核细胞, 数据以平均数 \pm 标准差表示。

有 * 者表示与未加 MPO 组比较, $P < 0.01$ 。采用 Student's t test 检测。

实施例 10 人尿 MPO 对小鼠巨核细胞和血小板生成的体内作用

使用实施例 1 中用 Superose-6 分离后的第一组份(第 20—22 管)作为试验用人尿 MPO 组份。在每只 Balb/c 小鼠的腹腔内注射 MPO 组份 100μ g/次, 每日二次, 共注射 4 天。对照组小鼠则以同样方

式注射 PBS。最后一次注射后第 4 天,取小鼠血用细胞计数器计算末梢血细胞数量,同时取骨髓作祖细胞(CFU-MK 和 CFU-GM)和巨核细胞数量分析。整个分析采用文献报道方法(Han 等, C R Acad Sci Paris 313:553—558, 1991),其结果见表 8。

表 8

骨髓(/ 10^5 细胞)						
	CFU-MK	巨核细胞	CFU-GM	血小板 万/ 10^3 mm	白细胞 / 10^3 mm	血红蛋白 g/100ml
PBS	34±3	159±12	44±3	908±24	2500±400	15±2
MPO	67±5 *	288±13 *	51±4	1240±35 *	3500±350	15±3

有 * 者表示与 PBS 组对比, $P < 0.05$, 采用 Student's t test 检测。

由上述试验结果可见, MPO 不但在体外能刺激巨核细胞生长, 注射入体内也能刺激巨核细胞和血小板的生长, 因此有希望成为治疗血小板减少症的药剂。

实施例 11 MPO 扩增正常小鼠造血干细胞和对人脐带血单个细胞分化的作用

本发明所述的 MPO 还可用作体外和离体体内造血干细胞扩增试剂, 包括单用扩增巨核细胞, 与其它因子合用扩增各系的祖细胞。应用 MPO 体外扩增小鼠造血干细胞的结果见表 9, 而应用 MPO 体外扩增人 $CD34^+$ 细胞和糖蛋白为 II b/III a 阳性细胞的结果见表 10。

表 9

预孵育因子	HPP-CFC	CFU-MK	CFU-GM	BFU-E
无(PBS)	0	$5 \pm 1/10^5$ 细胞	$10 \pm 2/10^5$ 细胞	0
人 MPO(100ng/ml)	$7 \pm 1/10^5$ 细胞	$35 \pm 4/10^5$ 细胞	$12 \pm 3/10^5$ 细胞	$1 \pm 0.2/10^5$ 细胞
鼠 SCF(100ng/ml)	$8 \pm 1/10^5$ 细胞	$21 \pm 4/10^5$ 细胞	$17 \pm 3/10^5$ 细胞	$2 \pm 1/10^5$ 细胞
鼠 IL3(100ng/ml)	$2 \pm 1/10^5$ 细胞	$28 \pm 1/10^5$ 细胞	$23 \pm 5/10^5$ 细胞	0
鼠 GM-SCF (100ng/ml)	$3 \pm 1/10^5$ 细胞	$12 \pm 2/10^5$ 细胞	$37 \pm 4/10^5$ 细胞	0
人 EPO(2U/ml)	0	$8 \pm 1/10^5$ 细胞	$7 \pm 1/10^5$ 细胞	$25 \pm 4/10^5$ 细胞
人 PF4(1 μ g/ml)	$6 \pm 1/10^5$ 细胞	$27 \pm 2/10^5$ 细胞	$17 \pm 2/10^5$ 细胞	$2 \pm 1/10^5$ 细胞
MPO+SCF	$37 \pm 5/10^5$ 细胞	$67 \pm 6/10^5$ 细胞	$24 \pm 5/10^5$ 细胞	$3 \pm 1/10^5$ 细胞
MPO+IL3	$17 \pm 4/10^5$ 细胞	$73 \pm 6/10^5$ 细胞	$42 \pm 2/10^5$ 细胞	$7 \pm 1/10^5$ 细胞
MPO+GM-CSF	$15 \pm 3/10^5$ 细胞	$39 \pm 3/10^5$ 细胞	$77 \pm 4/10^5$ 细胞	0
MPO+EPO	$11 \pm 2/10^5$ 细胞	$7 \pm 1/10^5$ 细胞	$17 \pm 3/10^5$ 细胞	$47 \pm 4/10^5$ 细胞
MPO+PF4	$34 \pm 4/10^5$ 细胞	$77 \pm 8/10^5$ 细胞	$7 \pm 1/10^5$ 细胞	$4 \pm 3/10^5$ 细胞

注:小鼠骨髓细胞(10^6 细胞/ml)预先与上述因子孵育 48 小时,然后按 Han 方法(J. Lab & Clin Med, 1994; 123:610-616)在含 2% 再障猪血清的血浆凝块体系中培养 10 天,检测各种集落的数量。

表 10

	对照	MPO(100ng/ml)
SCF 结合细胞	6%	13%
CD34 阳性细胞	0.3%	4.2%
CD41a 阳性细胞	3%	8.2%

注:人脐带血单个细胞分离后在含或不含 MPO 的液体培养基中培养 7

天,经洗涤后,细胞分别与荧光标记的抗 CD34 抗体,抗 CD34 α 抗体和 SCF 孵育 40 分钟,洗涤后用 FACS(荧光激活细胞分离仪)分析结果。

上述具体实施例的描述揭示了本发明的一般性质,从而使其他技术人员通过应用目前的知识,为了各种应用能容易地修饰和/或改动这些具体实施例而没有背离本发明的一般构思,因而这些改动和修饰应是属于这些公开例子的等价事例的范围和内涵之中。应理解,此处所采用的措辞或术语是为了便于描述,而不起限制作用。

序列 1: 人 MPO 的氨基酸序列

```

      5      10      15      20      25
1  M A W K T L P I Y L L L L S V F V I Q Q V S S Q
26 D L S S C A G R C L E G Y S R D A T C N C D Y N C
51 Q H Y M E C C P D C F K R V C T A E L S C K G R C F
75 E S F E R G R E C D D A Q C K K Y D K C C P D Y
101 E S F C A E V H N P T S P K P P N K K K T K K V I E
126 S Q T I K S T T K R S P K P P N K K K P T P K P P V
151 S E E I T E V K D N G D F K V T T P R P S L P P N S
176 V D E A G S G L D N T A K E T I N V E T Q S I E K T S A
201 N K V S T S P K I T V N K E T I N V E T Q S I E K T S A
226 D T S K E T S L T V N K E T I N V E T Q S I E K T S A
251 K Q T S T D G K E K T T S A T T Q S I E K T S A
276 K D L A P T S K V L A K P T P K E P A S T T P K E P T P
301 L T T P K E P T P T P K E P A S T T P K E P T P
326 T T I K S A P T T P K E P A S T T P K E P T T P
351 K E P A P T T T K E P A P T T P K E P A P T T P
376 E P A P T T T K S H P P L P R S C X X X C T Q P
401 T P K E P H P P L P R S C X X X C T Q P
426 K E P A P T A P K K P A P L P P P L E X X X K K K
451 K K

```

序列 2: 人 MPO cDNA 的核苷酸序列

```
1  TTTCAGGTAC CGTAGGTACC CTTGCCGTAA AGGATGGCAT
41  GGAAAACACT TCCCATTAC CTGTTGTTGC TGCTGCTGT
81  TTTCGTGATT CAGCAAGTTT CATCTCAAGA TTTATCAAGC
121 TGTGCAGGGA GATGTGGGGA AGGGTATTCT AGAGATGCCA
161 CCTGCAACTG TGATTATAAC TGTCAACACT ACATGGAGTG
201 CTGCCCTGAT TTCAAGAGAG TCTGCACTGC GGAGCTTTCC
241 TGTAAGGGCC GCTGCTTTGA GTCCTTCGAG AGAGGGAGGG
281 AGTGTGACTG CGACGCCCAA TGTAAGAAAT ATGACAAGTG
321 CTGTCCCGAT TATGAGAGTT TCTGTGCAGA AGTGCATAAT
361 CCCACATCAC CACCATCTTC AAAGAAAGCA CCTCCACCTT
401 CAGGAGCATC TCAAACCATC AAATCAACAA CCAAAAGTTC
441 ACCCAAACCA CCAAAACAAG AAGAGACTAA GAAAGTTATA
481 GAATCAGAGG AAATAACAGA AGTAAAAGAT AACAAAGAAG
521 ACAGAACTAA AAGAAACCT ACCCCCAAAC CACCAGTTGT
561 AGATGAAGCT GGAAGTGGAT TGGACAATGG TGACTTCAAG
601 GTCACAACTC CTGACACGTC TACCAACCAA CACAAATAAAG
641 TCAGCACATC TCCCAAGATC ACACACGCAA AACCAATAAA
681 TCCCAGACCC AGTCTTCCAC CTAATTCTGA TACATCTAAA
721 GAGACGTCTT TGACAGTGAA TAAAGAGACA ACAGTTGAAA
761 CTAAAGAAAC TACTACAAAC AATAAACAGA CTTCAACTGA
801 TGGAAAGAG AAGACTACTT CCGCTAAAGA GACACAAAGT
841 ATAGAGAAAA CATCTGCTAA AGATTTAGCA CCCACATCTA
881 AAGTGCTGGC TAAACCTACA CCCAAAGCTG AACTACAAAC
921 CAAAGGCCCT GCTCTACCA CTCCCAAGGA GCCCACGCCC
961 ACCACTCCCA AGGAGCCTGC ATCTACCAAC CCCAAAGAGC
1001 CCACACCTAC CACCATCAAG TCTGCACCCA CCACCCCAAC
1041 GGAGCCTGCA CCCACCAACA CCAAGTCTGC ACCCACCACT
1081 CCCAAGGAGC CTGCACCCAC CACCACCAAG GAGCCTGCAC
1121 CCACCACTCC CAAAGGAGCCT GCACCCACCA CCAACCAAGG
1161 GCCTGCACCC ACCACCAACA AGTCTCACCC ACCCACTCCC
1201 AGGAGCTGCA C???????? ?TGACCCCAA CCAACTCCCC
1241 AGGAGCCTCA CCCACCACTC CCAAGGAGCC TGCACCCACC
1281 AACCAAGGAG CCTGCACCCA CCACTCCCAA AGAGCCTGCA
1321 CCCACTGCCC CCAAGAAAGC TGCCCCCTCA CCCCCTCTAG
1361 AGCC?????? ?AAAAA AAAA
```

权 利 要 求 书

1. 一种人促巨核细胞生成素 MPO, 其特征在于, 为含有图 2 所列氨基酸序列的蛋白质或其活性片断。
2. 一种 MPO 的纯化方法, 其特征在于, 包括以与麦胚凝集素偶联的载体和与肝素偶联的载体为层析载体的亲和层析分离。
3. 根据权利 2 所述的 MPO 的纯化方法, 其特征在于, 与麦胚凝集素和肝素偶联的载体为琼脂糖。
4. 编码 MPO 的 DNA 分子, 其特征在于, 含
 - (A) 图 3 所示核苷酸序列的全部; 或
 - (B) 图 3 所示核苷酸序列的一部分; 或
 - (C) 能与(A)或(B)杂交的核苷酸序列。
5. 一种 MPO 的 cDNA 克隆方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - 1) 根据 MPO 的氨基酸序列, 用已知的遗传密码推测出与这些氨基酸相应的核苷酸;
 - 2) 设计变性引物进行 PCR 扩增;
 - 3) 用特异性 cDNA 扩增产物作为探针从人 cDNA 文库中筛选出 MPO 的 cDNA。
6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述人 cDNA 文库为人胚肝 cDNA 文库。
7. 一种用于表达 MPO 的质粒, 其特征在于, 含权利要求 4 所述的 DNA 分子。
8. 根据权利要求 7 所述的质粒, 其特征在于, 所述质粒选自 pGEM、pVL1392 和 pSV2。
9. 一种在宿主细胞中表达 MPO 的方法, 其特征在于, 使用权利要求 7 或 8 所述的质粒。
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述宿主细胞是真核细胞。
11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其特征在于, 所述真核细胞是哺

- 乳类动物细胞。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述哺乳类动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
13. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述真核细胞是昆虫细胞。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述昆虫细胞是 Sf9 细胞。
15. 重组 MPO,其特征在于,由权利要求 9—14 中任一项所述的方法产生。
16. 一种药用组合物,其特征在于,包含 MPO 和/或其突变蛋白。
17. 根据权利要求 16 所述的药用组合物,其特征在于,还包括细胞因子和血细胞生长因子。
18. 根据权利要求 17 所述的药用组合物,其特征在于,所述细胞因子和血细胞生长因子选自干细胞因子、白介素 3、6 和 11、促红细胞生成素、粒单以及粒细胞集落形成刺激因子和血小板第 4 因子。
19. 根据权利要求 16—18 中任一项所述的药用组合物,其特征在于,还包括多糖物质。
20. 根据权利要求 19 所述的药用组合物,其特征在于,多糖物质为肝素。
21. 一种用于研究造血细胞生长调节或 MPO 受体的试剂,其特征在于,含有 MPO 和/或其突变蛋白。
22. 一种用于制备抗 MPO 的单克隆或多克隆抗体的抗原,其特征在于,所述抗原是 MPO 或其突变蛋白。
23. 一种抗体,其特征在于,是用权利要求 22 所述的抗原制备的。
24. 一种用于扩增巨核细胞和血小板的试剂,其特征在于,含 MPO 和/或 MPO 突变蛋白。
25. 一种用于扩增造血干细胞、巨核细胞和血小板,治疗血小板减少症和/或全血细胞减少症的药物,其特征在于,所述药物选自 MPO、MPO 突变蛋白和根据权利要求 16—20 中任一项所述的药用组合物。

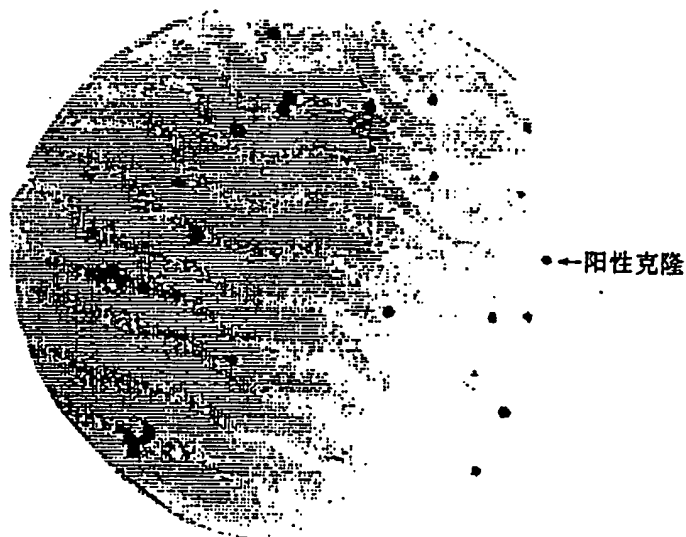


图 1

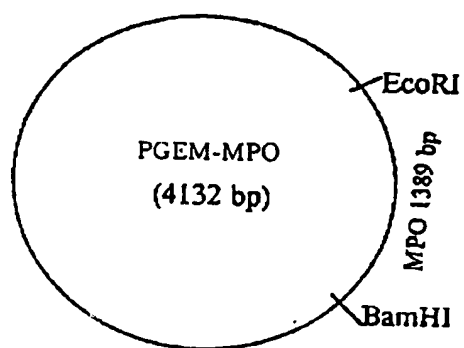


图 2

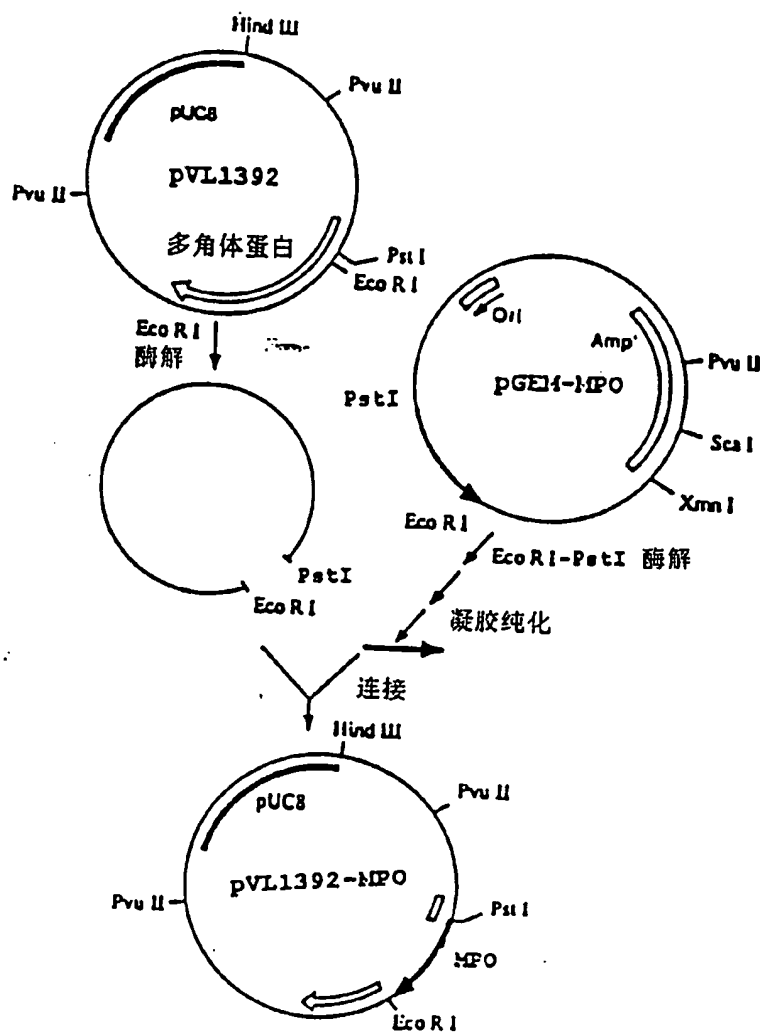


图 3

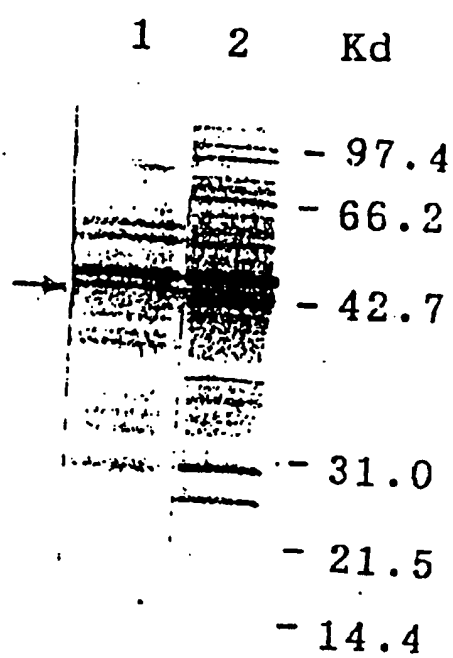


图 4

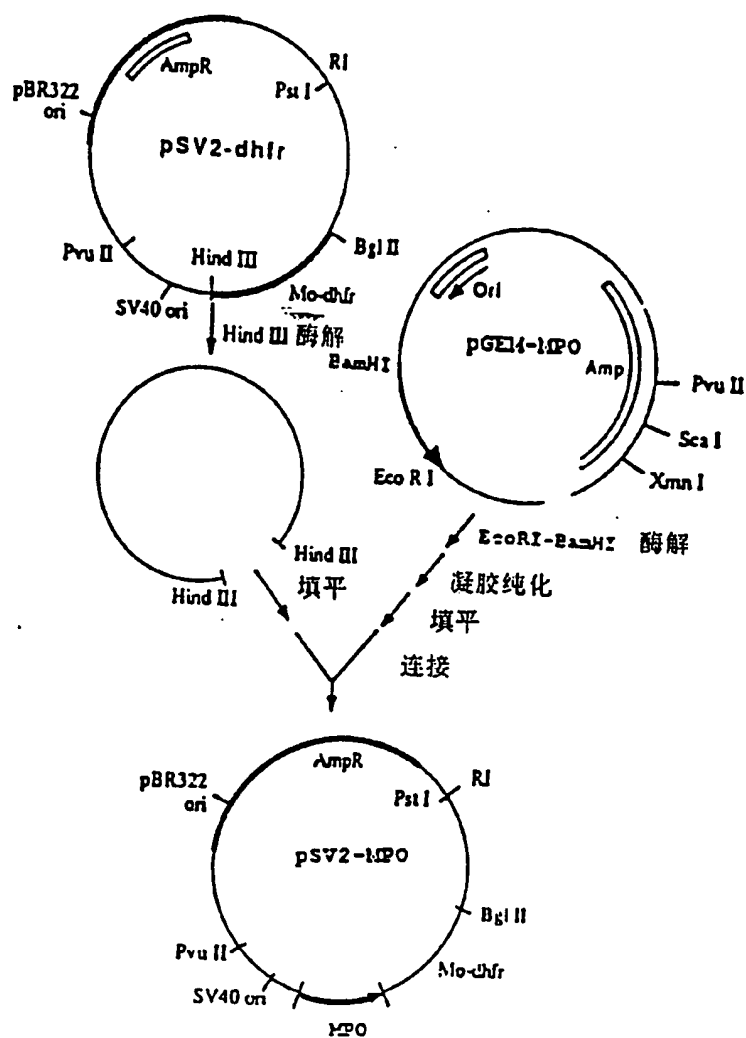


图 5

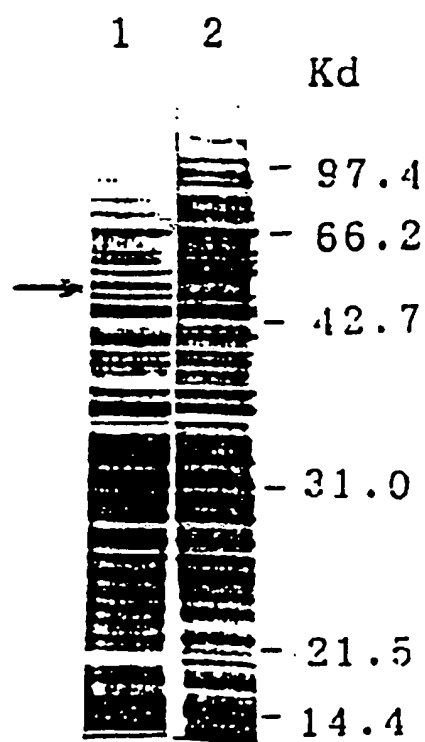


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN 95/00015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁸ C12N 15/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁸ C12N 15/19, C12N 15/79, C12N 21/02, A61K 35/14, A61K 35/22, A61K 37/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 94/10312 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 11 May 1994 Whole document	1-18
Y	WO, A, 90/12108 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 18 October 1994 Whole document	1-3, 16-20
Y	Kawakita et al., "Characterization of Human Megakaryocyte Colony—Stimulating Factor Urinary Extracts From Patients With Aplastic Anemia and Idropathic Thrombocytopenic Purpura" Blood 61(3) P. 556-560 (March 1993), Whole document	1-3
A	EP, A, 354989 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 21 February 1990 Whole document	1-4
A	WO, A, 92/12177 (ASHHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 23 July 1992 Whole document	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claims (s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June 1995 (15.06.95)

Date of mailing of the international search report

29.6月1995 (29.06.95)

Name and mailing address of the ISA/

Chinese Patent Office, 6 Xitucheng Rd. Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China

Facsimile No. (86-1)2019451

Authorized officer

Ma Zhaorou

Telephone No. (86-10)2093906

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family member

International application No.

PCT/CN 95/00015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO. A. 94/10312	11. 05. 94	AU. A. 52865 JP. A. 107366	24. 05. 94 25. 01. 94
WO. A. 90/12108	18. 10. 94	AU. A. 641645 US. A. 5260417 EP. A. 466780	30. 09. 93 09. 11. 93 26. 08. 92
WO. A. 92/12177	23. 07. 92	AU. A. 646630. JP. A. 5247095 EP. A. 517925	24. 02. 94 29. 09. 93 24. 08. 94
EY. A. 0354989	21. 02. 90	none	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 95/00015

A. 主题的分类 IPC⁵ C12N 15/19

按照国际专利分类表 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类体系和分类号)

IPC⁵ C12N15/19, C12N15/79, C12N21/02, A61K35/14, A61K35/22, A61K37/24

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

C. 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
Y	WO, A, 94/10312 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 11. 5月 1994, 全文	1-18
Y	WO, A, 90/12108 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 18. 10月 1994, 全文	1-3, 16-20
Y	Blood (1983年3月), 第61卷第3期, 第556-560页, Kawakita等人, "CHARacterization of Human Megakarocyte Colony-Stimulating Factor Urinary Extracts From Patients With Aplastic Anemia and Idropathic Thrombocytopenic Purpura", 全文	1-3
A	EP, A, 354989 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 21. 2月 1990, 全文	1-4

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

• 引用文件的专用类型:

'A' 明确表示了一般现有技术, 不认为是特别相关的文件

'E' 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的

'L' 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件 (如详细说明)

'O' 涉及口头公开、使用、展览或其它手段的文件

'P' 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

'T' 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

'X' 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

'Y' 特别相关的文件; 当该文件与其它一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性

'&' 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

15. 6月 1995 (15. 06. 95)

国际检索报告邮寄日期

29. 6月 1995 (29. 06. 95)

国际检索单位名称和通讯地址 中国专利局
100088 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号

传真号 (86-10) 2019451

受权官员 马昭若



电话号码 (86-10) 2093906

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 95/00015

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
A	WO. A. 92/12177 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 23. 7月1992. 全文	1-20

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN 95/00015

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO, A, 94/10312	11. 05. 94	AU, A, 52865 JP, A, 107366	24. 05. 94 25. 01. 94
WO, A, 90/12108	18. 10. 94	AU, A, 641645 US, A, 5260417 EP, A, 466780	30. 09. 93 09. 11. 93 26. 08. 92
WO, A, 92/12177	23. 07. 92	AU, A, 646530 JP, A, 5247095 EP, A, 517925	24. 02. 94 29. 09. 93 24. 08. 94
EY, A, 0354989	21. 02. 90	无	

PCT

世界知识产权组织
国际局



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

(51) 国际专利分类号 5: C12N 15/19		A1	(11) 国际公布号: WO95/23861
			(43) 国际公布日: 1995年9月8日 (08.09.95)
(21) 国际申请号: PCT/CN95/00015		(81) 指定国: AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KR, LU, MX, NL, NO, NZ, PT, RO, RU, SE, SK, UA, US, VN, 欧洲专利 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
(22) 国际申请日: 1995年3月6日 (06.03.95)			
(30) 优先权: 94112066.X 1994年3月4日 (04.03.94) CN			
(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海贝特生物技术公司 (SHANGHAI BEITE BIOTECHNOLOGY CO. LTD.) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路 320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN)。		本国际公布: 包括国际检索报告。 包括经修改的权利要求。	
(72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 顾学范 (GU, Xuefan) [CN/CN]; 韩忠朝 (HAN, Zhongchao) [CN/CN]; 申庆祥 (SHEN, Qingxiang) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路 320号, 邮政编码:200031, Shanghai (CN)。		经修改的权利要求的公布日期: 1995年9月28日	
(74) 代理人: 上海专利商标事务所 (SHANGHAI PATENT AND TRADEMARK AGENCY); 中国上海市桂平路 435号, 邮政编码:200233, Shanghai (CN)。			
(54) Title: HUMAN MEGAKARYOCYTOPOIETIN AND ISOLATION THEREOF, cDNA CLONING, AND PREPARATION OF THE RECOMBINANT PROTEIN			
(54) 发明名称: 人促巨核细胞生成素及其纯化、cDNA克隆和重组蛋白质的制备方法和应用			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a new hematopoietic cell growth factor, the human megakaryocytopoietin, its isolation from urine and serum of patients with aplastic anemia using the known biochemistry techniques, and its cDNA cloning method. This factor capable of promoting the colony-forming of megacaryocytes, enlarging the size of megakaryocytes, stimulating the proliferation of multipotential stem cell. This factor can be used for treating thrombocytopenia and hematocytopenia.</p>			
(57) 摘要			
<p>本发明涉及采用生化方法从再生障碍性贫血病人的尿和血清中分离出一种新的造血细胞生长因子--人促巨核细胞生长素, 经氨基酸序列分析, 从人胚肝cDNA文库克隆出该因子的cDNA, 继后在昆虫和中国仓鼠卵巢细胞体系中表达出有活性的重组蛋白质因子。经小鼠体内外试验和人体骨髓体外培养分析, 该因子促进巨核细胞集落形成, 增大巨核细胞体积, 刺激血小板的生成;还促进多能干细胞的增殖。该因子可用于治疗各种血小板减少症和全血细胞减少症。</p>			

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AM 亚美尼亚	CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	ML 马里	SK 斯洛伐克
AT 奥地利	DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	MN 蒙古	SN 塞内加尔
AU 澳大利亚	DK 丹麦	MR 毛里塔尼亚	MX 墨西哥	SZ 斯威士兰
BB 巴巴多斯	EE 爱沙尼亚	MP 马里亚纳群岛	NE 尼日尔	TD 乍得
BE 比利时	ES 西班牙	MY 马来西亚	NL 荷兰	TG 多哥
BF 布基纳法索	FI 芬兰	NI 尼加拉瓜	NO 挪威	TJ 塔吉克斯坦
BG 保加利亚	FR 法国	NM 纳米比亚	NZ 新西兰	TM 土库曼斯坦
BJ 贝宁	GA 加蓬	NP 尼泊尔	PL 波兰	TT 特立尼达和多巴哥
BR 巴西	GB 英国	OR 阿曼	PT 葡萄牙	UA 乌克兰
BY 白俄罗斯	GE 格鲁吉亚	OS 奥地利	RO 罗马尼亚	UG 乌干达
CA 加拿大	GN 几内亚	PE 秘鲁	RU 俄罗斯联邦	US 美国
CF 中非共和国	GR 希腊	PF 法属波利尼西亚	SD 苏丹	UZ 乌兹别克斯坦
CG 刚果	HU 匈牙利	PG 巴布亚新几内亚	SE 瑞典	VN 越南
CH 瑞士	IE 爱尔兰	PH 菲律宾	SG 新加坡	
CI 科特迪瓦	IS 冰岛	PK 巴基斯坦	SI 斯洛文尼亚	
CM 喀麦隆	IT 意大利	PL 波兰		
CN 中国	JP 日本	PR 巴勒斯坦		

经修改的权利要求

国际局收到日：1995年8月25日 (25.08.95)；

原始权利要求 1,4,5 替换为新的权利要求 1,4,5, 权利要求2,3,6-25

保持不变 (共2页)

1. 一种人促巨核细胞生成素 MPO, 含有序列 1 所示氨基酸序列中的 1—395 位氨基酸, 其特征在于, 还含有由序列 1 所示 396—452 位氨基酸组成的多肽序列或其有效片断。
2. 一种 MPO 的纯化方法, 其特征在于, 包括以与麦胚凝集素偶联的载体和与肝素偶联的载体为层析载体的亲和层析分离。
3. 根据权利 2 所述的 MPO 的纯化方法, 其特征在于, 与麦胚凝集素和肝素偶联的载体为琼脂糖。
4. 编码 MPO 的 DNA 分子, 其特征在于, 含
 - (A) 序列 2 所示核苷酸序列的全部; 或
 - (B) 含由序列 2 中 1186—1389 位核苷酸组成的核苷酸序列或其有效片断的部分; 或
 - (C) 能与(A)或(B)杂交的核苷酸序列。
5. 一种 MPO 的 cDNA 克隆方法, 其特征在于, 包括以下步骤:
 - 1) 根据 MPO 的氨基酸序列, 用已知的遗传密码推测出与这些氨基酸相应的核苷酸;
 - 2) 设计含由序列 2 中 1186—1389 位核苷酸组成的核苷酸序列或其有效片断的变性引物进行 PCR 扩增;
 - 3) 用特异性 cDNA 扩增产物作为探针从人 cDNA 文库中筛选出 MPO 的 cDNA。
6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述人 cDNA 文库为人胚肝 cDNA 文库。
7. 一种用于表达 MPO 的质粒, 其特征在于, 含权利要求 4 所述的 DNA 分子。
8. 根据权利要求 7 所述的质粒, 其特征在于, 所述质粒选自 pGEM、pVL1392 和 pSV2。
9. 一种在宿主细胞中表达 MPO 的方法, 其特征在于, 使用权利要求 7 或 8 所述的质粒。
10. 根据权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述宿主细胞是真核细胞。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述真核细胞是哺乳类动物细胞。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述哺乳类动物细胞是中国仓鼠卵巢细胞。
13. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述真核细胞是昆虫细胞。
14. 根据权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述昆虫细胞是 Sf9 细胞。
15. 重组 MPO,其特征在于,由权利要求 9—14 中任一项所述的方法产生。
16. 一种药用组合物,其特征在于,包含 MPO 和/或其突变蛋白。
17. 根据权利要求 16 所述的药用组合物,其特征在于,还包括细胞因子和血细胞生长因子。
18. 根据权利要求 17 所述的药用组合物,其特征在于,所述细胞因子和血细胞生长因子选自干细胞因子、白介素 3、6 和 11、促红细胞生成素、粒单以及粒细胞集落形成刺激因子和血小板第 4 因子。
19. 根据权利要求 16—18 中任一项所述的药用组合物,其特征在于,还包括多糖物质。
20. 根据权利要求 19 所述的药用组合物,其特征在于,多糖物质为肝素。
21. 一种用于研究造血细胞生长调节或 MPO 受体的试剂,其特征在于,含有 MPO 和/或其突变蛋白。
22. 一种用于制备抗 MPO 的单克隆或多克隆抗体的抗原,其特征在于,所述抗原是 MPO 或其突变蛋白。
23. 一种抗体,其特征在于,是用权利要求 22 所述的抗原制备的。
24. 一种用于扩增巨核细胞和血小板的试剂,其特征在于,含 MPO 和/或 MPO 突变蛋白。
25. 一种用于扩增造血干细胞、巨核细胞和血小板,治疗血小板减少症和/或全血细胞减少症的药物,其特征在于,所述药物选自 MPO、MPO 突变蛋白和根据权利要求 16—20 中任一项所述的药用组合物。